

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Sabina Drempetić

**POVEZANOST KONCENTRACIJE
BAKRA U SJEMENOJ PLAZMI S
PARAMETRIMA ANALIZE SJEMENE
TEKUĆINE**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Sabina Drempetić

**POVEZANOST KONCENTRACIJE
BAKRA U SJEMENOJ PLAZMI S
PARAMETRIMA ANALIZE SJEMENE
TEKUĆINE**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je izrađen na Medicinskom fakultetu Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor: doc. dr. sc. Sanja Mandić, mag. med. biochem.

Neposredni voditelj: dr. sc. Dario Mandić

Rad ima: 24 strane, 5 tablica i 1 sliku.

Veliko hvala prije svega mentorici doc. dr. sc. Sanji Mandić te neposrednom voditelju dr. sc. Dariu Mandiću na pruženoj prilici za suradnju, izdvojenom vremenu, strpljenju, potpori, brojnim savjetima te pomoći u realizaciji ovog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Jasni Jurasović s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu i doc. dr. sc. Suzani Čavar iz Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije na pomoći u određivanju koncentracije bakra u sjemenoj plazmi.

Nadalje, hvala svim profesorima Medicinskog fakulteta Osijek te svim djelatnicima Zavoda za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek na znanju koje su mi prenijeli tijekom ovog studija te time pomogli mojem stručnom i znanstvenom usavršavanju.

Hvala svim kolegama, a osobito kolegici Viktoriji, koji su moje studiranje učinili ljepšim i ugodnijim.

Najiskrenije zahvale dugujem svojim roditeljima Zlatku i Kseniji bez čijeg odricanja, potpore i razumijevanja ništa od ovog ne bi bilo moguće. Hvala i mojoj braći te cijeloj mojoj obitelji i svim prijateljima koji su bili uz mene na ovom naizgled dugom i ponekad iscrpnom putu obrazovanja, a koji je, zahvaljujući njima prošao glatko i za tren.

Popis kratica

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija

FSH – folikulostimulirajući hormon

LH – luteinizirajući hormon

KBC – Klinički bolnički centar

ICP – MS – Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom

ORS – *Octopole Reaction System*

LOD – granica detekcije

LOQ – granica kvantifikacije

IQR – interkvartilni raspon

AAS – atomska apsorpcijska spektrofotometrija

SADRŽAJ

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | UVOD | 1 |
| 1.1. | Teški metali..... | 1 |
| 1.2. | Uzroci neplodnosti | 1 |
| 1.2.1. | Neplodnost u Hrvatskoj..... | 2 |
| 1.3. | Sjemena tekućina..... | 2 |
| 1.4. | Spermigram..... | 2 |
| 1.5. | Sjemena plazma | 3 |
| 1.6. | Bakar..... | 3 |
| 2. | HIPOTEZA | 5 |
| 3. | CILJ..... | 6 |
| 4. | ISPITANICI I METODE (MATERIJAL I METODE) | 7 |
| 4.1. | Ustroj studije | 7 |
| 4.2. | Ispitanici (materijal) | 7 |
| 4.3. | Metode | 7 |
| 4.3.1. | Prikupljanje uzoraka..... | 7 |
| 4.3.2. | Spermigram..... | 8 |
| 4.3.3. | Određivanje Cu metodom ICP – MS | 9 |
| 4.4. | Statističke metode | 10 |
| 5. | REZULTATI | 11 |
| 5.1. | Povezanost koncentracije bakra u sjemennoj plazmi s koncentracijom spermija u sjemennoj tekućini | 11 |
| 5.2. | Povezanost koncentracije bakra u sjemennoj plazmi s morfologijom spermija u sjemennoj tekućini | 12 |
| 5.3. | Povezanost koncentracije bakra u sjemennoj plazmi s vitalnošću spermija u sjemennoj tekućini | 13 |
| 5.4. | Povezanost koncentracije bakra u sjemennoj plazmi s pokretljivošću spermija u sjemennoj tekućini | 14 |
| 6. | RASPRAVA..... | 16 |
| 7. | ZAKLJUČAK..... | 18 |
| 8. | SAŽETAK..... | 19 |
| 9. | SUMMARY | 20 |
| 10. | LITERATURA | 21 |
| 11. | ŽIVOTOPIS | 24 |

1. UVOD

Međunarodni rast industrijske i poljoprivredne proizvodnje rezultirao je povećanim izlaganjem raznim supstancama koje su potencijalno štetne za zdravlje ljudi. Između ostalog, znanstvenici sve više usmjeravaju svoj interes na teške metale kojih je posljednjih godina sve više u tlu, naročito u urbanim sredinama, a čije onečišćenje može imati izravan utjecaj na javno zdravlje (1).

1.1. Teški metali

Teški metali prirodni su elementi koji imaju visoku atomsku masu i gustoću najmanje pet puta veću od vode. Njihova višestruka industrijska, domaća, poljoprivredna, medicinska i tehnološka primjena dovela je do njihove široke rasprostranjenosti u okolišu, što izaziva zabrinutost zbog njihovih potencijalnih učinaka na ljudsko zdravlje i okoliš. Teški metali koji se koriste u medicinskim protezama ili su prisutni u zalihama vode ili u duhanu mogu se nakupiti u tkivima i krvi. Poznato je da izazivaju toksične učinke (1). Njihova toksičnost ovisi o nekoliko čimbenika, uključujući dozu, put izlaganja i vrste kemijskih spojeva u kojima sudjeluju, kao i dob, spol, genetika i nutritivni status izloženih pojedinaca. Izlaganje teškim metalima, između ostalog, povezuje se s problemom neplodnosti. Istraživanja su ukazala na mogućnost da bi izloženost teškim metalima mogla imati negativan utjecaj na muški reproduktivni sustav (2).

1.2. Uzroci neplodnosti

Unatoč činjenici da stvarni uzroci neplodnosti ostaju nepoznati, mnoga istraživanja pokazuju kako funkcionalnost spermija slabi i opada između ostalog i zbog ekoloških čimbenika, kao što su izloženost pesticidima, teškim metalima ili endokrinim disruptorima. Smatra se da oni negativno utječu na spermatogenezu. Procjenjuje se da oko 6 % muškaraca u reproduktivnoj dobi pokazuje simptome neplodnosti. Problemi sa spermatogenezom čine 90 % svih uzroka neplodnosti kod muškaraca. Drugi su uzroci povezani s promjenama u transportu spermija i pomoćnim žlijezdama u muškom genitalnom traktu (6 %), erektilni poremećaji (2 %), poremećaji ejakulacije (1 %) te funkcionalne promjene u spermi (1 %). U navedenim situacijama moguća je odsutnost spermija (azoospermija), smanjeni broj spermija (oligozoospermija), promjene u morfologiji, odnosno obliku spermija (teratozoospermija), promjena u pokretnosti spermija (astenozoospermija) ili promjena u vitalnosti spermija (nekrozoospermija) (3).

1.2.1. Neplodnost u Hrvatskoj

Rastuća učestalost neplodnosti u razvijenim zemljama postaje ozbiljan društveni i individualni problem. U Hrvatskoj je 80 do 100 tisuća parova neplodno, a pomoć godišnje potraži oko 10 tisuća parova (4). U 20 % slučajeva neplodnosti problem je u muškoj neplodnosti. Uzroci neplodnosti mogu biti različiti, a jedan od onih o kojima se danas najčešće govori je izloženost određenim tvarima iz okoliša koji imaju utjecaj na funkciju muškog reproduktivnog sustava (5).

1.3. Sjemena tekućina

Sjemena tekućina (ejakulat), odnosno sperma je žitka, sluzava, mutna, mliječnobijela do blijedožuta tekućina koja nastaje u muškim spolnim organima. Izbacuje se kroz vanjski otvor mokraćne cijevi, a sadrži muške spolne stanice, spermije. U približno 2 do 5 ml sperme nalazi se približno 200 do 300 x 10⁶ spermija. Glavninu volumena sperme tvori tekućina iz pridruženih žlijezda, najviše iz sjemenih mjehurića i prostate. Kemijski sastav sperme omogućuje idealne uvjete za pokretljivost spermija: nešto niža temperatura od tjelesne te koncentracija magnezija, kalija i kisika daju joj blagu lužnatost, koja poništava kiseli sadržaj rodnice. Uz fruktozu, koja je glavni izvor energije spermija, sperma sadrži i amilazu, kiselu fosfatazu, prostaglandine i fibrinolizin, te odljuštene epitelne stanice mokraćno-spolnih puteva, lipide i bjelancevine. Tvorba sperme počinje u doba spolnoga sazrijevanja, a smanjuje se starenjem. Različiti čimbenici mogu utjecati na sastav i količinu sperme. Sperma se može smrznuti i čuvati mjesecima ili godinama; tako zadržava sva biološka svojstva, pa se može rabiti za kasniju oplodnju (5, 6).

1.4. Spermogram

Spermogram je laboratorijska pretraga sperme, koja se u muškaraca uglavnom provodi radi procjene plodnosti, a rjeđe radi dijagnoze upalnih i tumorskih bolesti mokraćno-spolnoga sustava. Tom se pretragom utvrđuje volumen, boja, viskoznost, stupanj lužnatosti ili kiselosti sperme, potom pokretljivost, izgled i vitalnost spermija, te pojava mikroorganizama, eritrocita, epitelnih i upalnih stanica u spermi. Spermogram dopunjen biokemijskim pretragama pokazuje koncentracije više parametara od kojih se kod nas rade cink, fruktoza i citrati. Referentne vrijednosti spermograma prikazane su u Tablici 1 (6, 7).

Tablica 1. Referentne vrijednosti za spermiogram (prema WHO)

| | |
|--|-----------------|
| Volumen sperme (ml) | 1,5 (1,4 – 1,7) |
| Totalni broj spermija po ejakulaciji ($\times 10^6$) | 39 (33 – 46) |
| Koncentracija spermija ($\times 10^6$ po ml) | 15 (12 – 16) |
| Totalna pokretljivost (PR + NP, %) | 32 (31 – 34) |
| Progresivna pokretljivost (PR, %) | 58 (55 – 63) |
| Vitalnost (živi spermiji, %) | 58 (55 – 63) |
| Morfologija spermija (normalnog oblika, %) | 4 (3,0 – 4,0) |

Brojčane vrijednosti predstavljaju 5. percentile s pripadajućim 95 % intervalom pouzdanosti.

1.5. Sjemena plazma

Sjemenu plazmu izlučuju spolne žlijezde i epididimisi. Sjemena plazma sadrži različite tvari koje utječu na funkciju i preživljavanje spermija tijekom prolaska kroz ženski spolni sustav, a ima i važne regulatorne funkcije u raznim procesima prije prodora spermija u jajnu stanicu. Funkcije se odnose na prehranu, zaštitu, regulaciju gibljivosti i kapacitaciju spermija te prepoznavanje i vezanje gameta. Makromolekule, lipidi, bjelančevine i minerali, sudjeluju u izgradnji i metaboličkim procesima spermija. Lipidi se nalaze u staničnoj membrani spermija, sudjeluju u metabolizmu i dozrijevanju spermija, hiperaktivaciji i akrosomskoj reakciji te oplodnji jajne stanice. Bjelančevine sudjeluju u dozrijevanju i oplodnji te vežu propale spermije. Minerali u sjemennoj plazmi uspostavljaju i održavaju osmotsku ravnotežu, djeluju antibakterijski i neophodni su za pravilno gibanje spermija. Neki od minerala su sastavni dijelovi enzima, dok drugi sudjeluju u njihovoj aktivaciji. Istraživanja neplodnosti muškaraca usmjerena su sve više na analiziranje i određivanje parametara sjemene plazme jer se ustvrdilo da brojnost i gibljivost spermija nisu jedino mjerilo uspješne oplodnje već je nužan kvalitetan medij za održavanje njihovih karakteristika. Sjemena plazma ima ulogu u održavanju spermija sposobnim za oplodnju, osigurava im medij za transport unutar kojega im pruža zaštitu od oksidacijskog stresa te osigurava nutrijente potrebne za kapacitaciju i uspješnu oplodnju (8).

1.6. Bakar

Rezultati istraživanja objavljenih u posljednjih nekoliko godina upućuju na to da esencijalni metali ili metali u tragovima, uključujući bakar, mogu imati utjecaj na reprodukciju muškaraca. Primjerice, prema meta analizi objavljenoj 2017. godine, smatra se da olovo i

kadmij imaju direktan toksični učinak na testise, sprječavaju stvaranje sperme i induciraju morfološku promjenu sperme što dovodi do pada kvalitete i količine sperme (1).

Bakar je esencijalni mikroelement koji ima vrlo važnu ulogu u funkciji organizma. Bitan je element u mnogim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama. Važan je za funkciju mnogih enzima, uključen u mitohondrijsko disanje, apsorpciju željeza i uklanjanje slobodnih radikala. U organizam se može unijeti hranom (npr. orašasti plodovi, sjemenke, meso, školjke) te kroz uporabu bakrenog posuđa ili konzumacijom vode koja prolazi kroz bakrene cijevi. Poznata je i radna izloženost bakru. Kod intoksikacija bakrom na radnom mjestu dolazi do stanja nalik gripi koje se opisuje kao „metalna groznica“. Nedostatak aktivnosti bakroenzima može dovesti do smanjene pigmentacije i do niza patoloških stanja kao što su neutropenija i hipokromna anemija te je povećan rizik od koronarne bolesti srca. Povećana akumulacija bakra očituje se stanjima kao što su opstrukcija žuči te Wilsonova bolest.

Učinak bakra u reproduktivnom sustavu proučavao se još pedesetih godina prošlog stoljeća, a brojna istraživanja pokušala su utvrditi povezanost koncentracije bakra u različitim tkivima i tekućinama muškog reproduktivnog sustava s plodnošću. Značaj koncentracije bakra za plodnost i njegova povezanost s parametrima analize sjemene tekućine nije još do kraja utvrđena i rezultati dobiveni u različitim istraživanjima pokazali su kontradiktorne rezultate. Bakar je važan dio mnogih enzima, među kojima su superoksid dismutaza i katalaza. Superoksid dismutaza je enzim koji igra veliku ulogu u zaštiti ljudskih spermija od peroksidacijskog oštećenja staničnih enzima i struktura (9). Uloga bakra u sjemenoj tekućini za sad nije u potpunosti poznata, ali čini se da je uključen u mobilnost spermija te također može djelovati na receptore hipofize koji kontroliraju oslobađanje luteinizirajućeg hormona (LH). Bakar može djelovati na receptore folikulostimulirajućeg hormona (FSH) te tako interferirati u spermatogenezi. Razina bakra u sjemenoj plazmi može biti snižena u slučaju azoospermije, a može biti povećana u slučajevima oligospermije i astenoozoospermije, međutim rezultati različitih istraživanja su proturječni (1, 2, 9 – 14).

2. HIPOTEZA

Pretpostavka je da je koncentracija bakra u sjemenoj tekućini povezana s plodnošću muškarca. Naime, iako je bakar esencijalni element i neophodan je za mnoge funkcije u ljudskom organizmu, moguće je da bi izloženost prevelikim količinama mogao biti štetan te jedan od čimbenika neplodnosti. Pretpostavka je da koncentracija bakra ima utjecaj na spermatogenezu te da je povezan s parametrima analize sjemena kao što su koncentracija, morfologija, pokretljivost i vitalnost spermija.

3. CILJ

Glavni cilj istraživanja je utvrditi postoji li statistički značajna povezanost koncentracije bakra u sjemennoj plazmi s parametrima spermograma.

Specifični ciljevi su:

- 1) utvrditi povezanost koncentracije bakra u sjemennoj plazmi s koncentracijom spermija u sjemennoj tekućini
- 2) utvrditi povezanost koncentracije bakra u sjemennoj plazmi s morfologijom spermija u sjemennoj tekućini
- 3) utvrditi povezanost koncentracije bakra u sjemennoj plazmi s vitalnošću spermija u sjemennoj tekućini
- 4) utvrditi povezanost koncentracije bakra u sjemennoj plazmi s pokretljivošću spermija u sjemennoj tekućini

4. ISPITANICI I METODE (MATERIJAL I METODE)

4.1. Ustroj studije

Ustroj studije je presječna studija.

4.2. Ispitanici (materijal)

U ovom istraživanju sudjelovala je populacija muških pacijenata razne životne dobi, koja je postupku zbog ispitivanja neplodnosti. Navedeni ispitanici dolaze iz različitih gradova, mjesta te sela uglavnom s područja istočne Hrvatske. Uzorkovanje je napravljeno u razdoblju od rujna 2016. godine do siječnja 2017. godine (razdoblje od 4 mjeseca). Svi uzorci su zaprimljeni u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku u KBC Osijek. Traženi uzorak bila je sjemena tekućina. Iz istraživanja bi se isključili ispitanici koji imaju nedovoljnu količinu sjemene tekućine za kompletnu obradu uzorka, oni kojima nije došlo do lize koaguluma te zbog toga nije moguće napraviti morfološku i biokemijsku analizu sjemene tekućine te ispitanici koji su upućeni u obradu zbog nekih drugih razloga. Prikupljeni uzorak sjemene tekućine koristio se za izradu spermioograma, a ostatni uzorak sjemene plazme koristio se za određivanje koncentracije bakra. Ispitanici su podijeljeni u skupine prema koncentraciji, morfologiji, vitalnosti i pokretljivosti spermija. Svi ispitanici uključeni u ovo istraživanje su potpisali informirani pristanak, a istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva KBC Osijek i napravljeno u skladu s Helsinškom deklaracijom.

4.3. Metode

4.3.1. Prikupljanje uzoraka

Uzorak ejakulata sakupljen je masturbacijom ispitanika u prikladnu posudu nakon apstinencije od seksualnih aktivnosti od četiri dana. Dobiveni uzorak se nakon uzorkovanja u posudici koagulira, ali se stajanjem uzoraka na sobnoj temperaturi oko 30 minuta u njemu odvija likvefakcija, odnosno ponovni prelazak ejakulata u tekuće stanje i stvaranje sjemene plazme djelovanjem enzima iz prostate. Nakon toga smo sjemenu plazmu odvojili centrifugiranjem na 1500 x g 10 minuta. Uzorke sjemene plazme nakon centrifugiranja smo pohranili u prikladne posudice do analize na – 20 ° C.

Prije analize, smrznuti uzorci bi se izvadili iz hladnjaka i ostavili temperirati na sobnoj temperaturi, a prije daljnje obrade bi se nježno homogenizirali.

4.3.2. Spermioqram

Prema protokolu WHO – a, u uzorcima sjemene tekućine napravljeni su osnovni parametri mikroskopske analize spermiograma (6).

4.3.2.1. Određivanje koncentracije spermija

Koncentracija spermija određena je brojanjem u Maklerovoj komorici. Maklerova komorica je dubine 10 μm , sastoji se od dva stakla. Gornje staklo služi kao pokrovnica i na njemu se nalazi mrežica podijeljena na 100 kvadratića, od kojih je svaki površine 0,1 x 0,1 μm . Mala kapljica dobro homogeniziranog uzorka sjemene tekućine aplicira se staklenim štapićem na sredinu komorice i smjesta poklopi gornjim staklom s mrežicom. Nakon toga se mikroskopira pod povećanje od 20 x i broje se spermiji u 10 kvadratića, a konačni zbroj predstavlja koncentraciju spermija u milijunima po mililitru.

4.3.2.2. Određivanje vitalnosti spermija

Vitalnost spermija određuje se mikroskopiranjem obojenog preparata. Za bojanje se primjenjuje eozin / nigrozinska metoda koja omogućuje dobro razlikovanje živih i mrtvih spermija. Kapljica dobro homogeniziranog uzorka sjemene tekućine aplicira se staklenim štapićem na predmetno stakalce, doda se jedna kap 5 % - tne vodene otopine eozina i jedna kap 2 % - tne vodene otopine nigrozina, sve se dobro promiješa i nakon toga napravi razmaz na predmetnom stakalcu. Nakon što se razmaz osuši na zraku, odmah se promatra pod mikroskopom pri povećanju od 1000 x pod uljnom imerzijom. Broji se 100 spermija i određuje se broj živih (neobojeni) i mrtvih (obojeni) spermija.

4.3.2.3. Određivanje morfologije spermija

Morfologija spermija određuje se mikroskopiranjem obojenog preparata. Za bojanje se primjenjuje modificirana metoda prema Papanicolau. Kapljica dobro homogeniziranog uzorka sjemene tekućine aplicira se staklenim štapićem na predmetno stakalce i razvuče se rubom drugog stakalca preko površine pazeći da razmaz ne bude prevelike debljine (rade se dva razmaza paralelno) i ostavi da se osuši na zraku. Nakon sušenja razmaza fiksiramo uranjanjem u smjesu etilnog alkohola i etera (50 : 50 v / v) gdje se ostave kako bi stajale najmanje 1 sat. Nakon fiksiranja, razmaz se osuši i boji na sljedeći način: *Papanicolau's Solution 1a Harris's Hematoxylin Solution* – 4 minute; *Papanicolau's 2a Orange G Solution (OG6)* – 2 minute; *Papanicolau's Solution 3b Polychromatic Solution EA50* – 6 minuta, nakon čega se ispere pod mlazom vode, ispere se dva puta s 96 % - tnim etilnim alkoholom i ostavi se stajati u otopini ksilola 1 – 2 sata. Broji se 100 spermija, a diferenciraju se normalni oblici od patološki

promijenjenih. Patološke promjene mogu se manifestirati pojedinačno na glavi, vratu ili repu spermija, a moguće su i kombinacije više patoloških promjena na jednom spermiju.

4.3.2.4. Određivanje pokretljivosti spermija

Pokretljivost spermija određuje se mikroskopiranjem nativnog preparata. Kapljica dobro homogeniziranog uzorka sjemene tekućine aplicira se staklenim štapićem na predmetno stakalce, prekrije se pokrovnim stakalcem i ostavi stajati jednu minutu. Nakon toga vršimo mikroskopiranje pod povećanjem od 400 x. Pregledavamo 4 – 6 vidnih polja, brojimo 100 živih spermija i klasificiramo ih u nepokretne i pokretne, a pokretne dalje klasificiramo u brzo progresivne, sporo progresivne i stacionarne.

4.3.3. Određivanje Cu metodom ICP – MS

Uzorci su pripremljeni za analizu na ICP – MS uređaju jednostavnom metodom razrjeđivanja s otopinom za diluciju sljedećeg sastava: 0,01 M EDTA (Sigma-Aldrich, Tokio, Japan), 0,004 % v / v NH_3 i 0,07 % v / v TritonX-100 (obadva BDH Chemicals Ltd, Poole, Engleska) uz dodatak internih standarda (Sc, Ge, Rh, Tb, Ir i Lu u koncentraciji 1 $\mu\text{g/l}$, svi nabavljeni od SCP Science, Quebec, Kanada). Uzorci sjemene plazme su razrjeđivani s gore navedenom otopinom za diluciju u omjeru 1 : 20 (150 μl sjemene plazme i 2850 μl otopine za diluciju).

Mjerenje je napravljeno na ICP – MS uređaju Agilent 7500 cx (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) opremljenim integriranim automatskim uzorkivačem, Octopole Reaction Systems (ORS) kolizijskom-reakcijskom ćelijom čija je uloga smanjenje potencijalnih interferencija, te MicroMist staklenim koncentričnim nebulizatorom i kvarcnom komorom za raspršivanje Scott tipa. Za određivanje Cu koristili smo helij kao kolizijski plin s detekcijom karakterističnog iona za Cu ($m/z = 63$) u spektrometru masa. Svi korišteni plinovi (Ar, He) su 99,999 % čistoće (Messer Hrvatska, Zaprešić, Hrvatska).

Instrumentalne postavke i uvjeti svakodnevno su optimizirani automatskim postavkama upravljačkog softvera uređaja kako bi pružili najbolju osjetljivost i najmanji potencijal interferencija.

Individualni standardi Cu (SCP Science, Quebec, Kanada) korišteni su za izradu kalibracijskih pravaca za određivanje Cu. Napravljeno je najmanje 5 kalibracijskih točaka razrjeđivanjem certificiranih standarda u očekivanom području koncentracija nepoznatih uzoraka (Cu 0 – 500 $\mu\text{g/l}$).

Za kontrolu kvalitete korišteni su komercijalni kontrolni uzorci ClinChek (Recipe, München, Njemačka) u dvije razine. Svi kalibratori i kontrole su razrjeđivani s dilucijskom otopinom na isti način kao i uzorci. Procijenjena granica detekcije (LOD) za Cu je 0,192 µg/l dok je granica kvantifikacije (LOQ) za Cu 0,639 µg/l.

4.4. Statističke metode

Rezultati su obrađeni statističkim programom MedCalc, verzija 12.4.0.0.0.0. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Za prikaz podataka koristila se deskriptivna statistika uz odgovarajuće srednje vrijednosti i standardne devijacije ili medijane i interkvartilne raspone (ovisno o normalnosti raspodjele). Normalnost raspodjela podataka ispitana je Kolmogorov – Smirnovljev testom. Ovisno o normalnosti raspodjele, za usporedbu dviju skupina kvantitativnih podataka korišteni su t-test ili Mann-Whitney U test. Za usporedbu više skupina korišten je test analize varijance (ANOVA) ili Kruskal-Wallisov test. $P < 0,05$ predstavlja razinu značajnosti koja se koristi za ocjenu statističke značajnosti dobivenih rezultata.

5. REZULTATI

Analiza podataka Kolmogorov – Smirnov testom pokazala je da isti ne slijede normalnu razdiobu tako da će sumarni statistički podatci biti prikazani kao medijan podataka s interkvartilnim rasponom, a za daljnju obradu su korišteni neparametrijski statistički testovi.

U ovom je istraživanju sudjelovalo ukupno 196 ispitanika. Medijan dobi svih ispitanika je 35 godina (IQR, interkvartilni raspon 31 – 39). Medijan koncentracije bakra (Cu) u sjemennoj plazmi kod svih ispitanika je 91,04 (IQR 70,69 – 117,90) µg/l.

5.1. Povezanost koncentracije bakra u sjemennoj plazmi s koncentracijom spermija u sjemennoj tekućini

Medijan koncentracije spermija u sjemennoj tekućini za sve ispitanike je 58,5 (IQR 20 – 116,5) x 10⁶/mL. S obzirom na koncentraciju spermija, 155 ispitanika (79 %) je imalo koncentraciju spermija u sjemennoj tekućini iznad donje granice referentnog područja (> 15 x 10⁶/mL) prema preporukama WHO-a (normozoospermija), 19 ispitanika (10 %) imalo je koncentraciju spermija u sjemennoj tekućini ispod donje granice referentnog područja prema preporukama WHO-a (oligozoospermija), a 22 ispitanika (11 %) pokazalo je potpuno odsustvo spermija u sjemennoj tekućini (azoospermija).

Tablica 2. Povezanost koncentracije bakra u sjemennoj plazmi s koncentracijom spermija u sjemennoj tekućini

A. Klasificirano u tri skupine prema koncentraciji spermija (normozoospermija, oligozoospermija, azoospermija)

| | Ispitanici s normozoospermijom (N = 155) | Ispitanici s oligozoospermijom (N = 19) | Ispitanici s azoospermijom (N = 22) | P |
|---|--|---|-------------------------------------|--------------------|
| Dob ispitanika (godine) | 34 (31 - 39) | 37 (34 - 41) | 35 (31 - 38) | 0,1385 |
| Koncentracija spermija u sjemennoj tekućini (x 10 ⁶ /mL) | 82 (43 - 136) | 7 (5 - 12) | 0 | < 0,0001 |
| Koncentracija Cu u sjemennoj plazmi (µg/l) | 88,84 (70,64 – 123,34) | 95,94 (73,70 – 115,50) | 96,06 (64,55 – 108,88) | 0,7588 |

Sve vrijednosti su medijan s interkvartilnim rasponom (IQR); P – statistička značajnost (Kruskal – Wallis test)

B. Klasificirano u dvije skupine prema koncentraciji spermija (normozoospermija, oligo- i azoospermija zajedno)

| | Ispitanici s normozoospermijom (N = 155) | Ispitanici s oligo- i azoospermijom (N = 41) | P |
|--|--|--|--------------------|
| Dob ispitanika (godine) | 34 (31 - 39) | 36 (32 - 39) | 0,2145 |
| Koncentracija spermija u sjemenoj tekućini (x 10 ⁶ /mL) | 82 (43 - 136) | 0 (0 - 6) | < 0,0001 |
| Koncentracija Cu u sjemenoj plazmi (µg/l) | 88,84 (70,64 – 123,34) | 95,94 (70,88 – 111,25) | 0,8648 |

Sve vrijednosti su medijan s interkvartilnim rasponom (IQR); P – statistička značajnost (Mann – Whitney test)

Koncentracija bakra u sjemenoj plazmi nije pokazala korelaciju s koncentracijom spermija u sjemenoj tekućini (Pearsonov koeficijent korelacije $r = 0,0798$, 95 % CI - 0,0611 - 0,2175, $P = 0,2665$).

5.2. Povezanost koncentracije bakra u sjemenoj plazmi s morfologijom spermija u sjemenoj tekućini

Medijan postotka morfološki normalnih spermija u sjemenoj tekućini za sve ispitanike je 20 % (IQR 13 – 26). S obzirom na morfologiju spermija, 172 ispitanika (88 %) imalo je postotak morfološki normalnih spermija iznad donje granice referentnog područja (> 4 %) prema preporukama WHO – a (normozoospermija), a 24 ispitanika (12 %) imalo je postotak morfološki normalnih spermija ispod donje granice referentnog područja prema preporukama WHO – a (teratozoospermia). Koncentracija bakra u sjemenoj plazmi nije pokazala korelaciju s postotkom morfološki normalnih spermija u sjemenoj tekućini (Pearsonov koeficijent korelacije $r = - 0,0098$, 95 % CI - 0,1498 - 0,1305, $P = 0,8914$).

Tablica 3. Povezanost koncentracije bakra u sjemenoj plazmi s morfologijom spermija u sjemenoj tekućini

| | Ispitanici s normozoospermijom (N = 172) | Ispitanici s teratozoospermijom (N = 24) | P |
|--|--|--|--------------------|
| Dob ispitanika (godine) | 35 (31 - 39) | 35 (31 - 39) | 0,9219 |
| Udio morfološki normalnih oblika spermija (%) | 22 (16 - 27) | 0 | < 0,0001 |
| Koncentracija Cu u sjemenoj plazmi (µg/l) | 90,53 (71,65 – 120,99) | 96,06 (60,21 - 110,17) | 0,5027 |

Sve vrijednosti su medijan s interkvartilnim rasponom (IQR); P – statistička značajnost (Mann – Whitney test)

5.3. Povezanost koncentracije bakra u sjemenoj plazmi s vitalnošću spermija u sjemenoj tekućini

Medijan postotka živih spermija u sjemenoj tekućini za sve ispitanike je 51 % (IQR 37,5 – 60). S obzirom na vitalnost spermija, 59 ispitanika (30 %) imalo je postotak živih spermija iznad donje granice referentnog područja (> 4 %) prema preporukama WHO-a (normozoospermija), a 137 ispitanika (70 %) imalo je postotak živih spermija ispod donje granice referentnog područja prema preporukama WHO – a (nekrozoospermija). Koncentracija bakra u sjemenoj plazmi nije pokazala korelaciju s postotkom živih spermija u sjemenoj tekućini (Pearsonov koeficijent korelacije $r = 0,02925$, 95 % CI - 0,1114 – 0,1687 $P = 0,6840$).

Tablica 4. Povezanost koncentracije bakra u sjemenjnoj plazmi s vitalnošću spermija u sjemenjnoj tekućini

| | Ispitanici s normalnom vitalnošću spermija (N = 59) | Ispitanici sa sniženom vitalnošću spermija (N = 137) | P |
|---|--|---|--------------------|
| Dob ispitanika (godine) | 34 (30 – 38) | 35 (31 – 40) | 0,5016 |
| Udio vitalnih spermija (%) | 65 (60 – 69) | 44 (30 – 52) | < 0,0001 |
| Koncentracija Cu u sjemenjnoj plazmi (µg/l) | 95,28 (72,95 – 119,49) | 89,53 (70,19 – 115,53) | 0,5755 |

Sve vrijednosti su medijan s interkvartilnim rasponom (IQR); P – statistička značajnost (Mann – Whitney test)

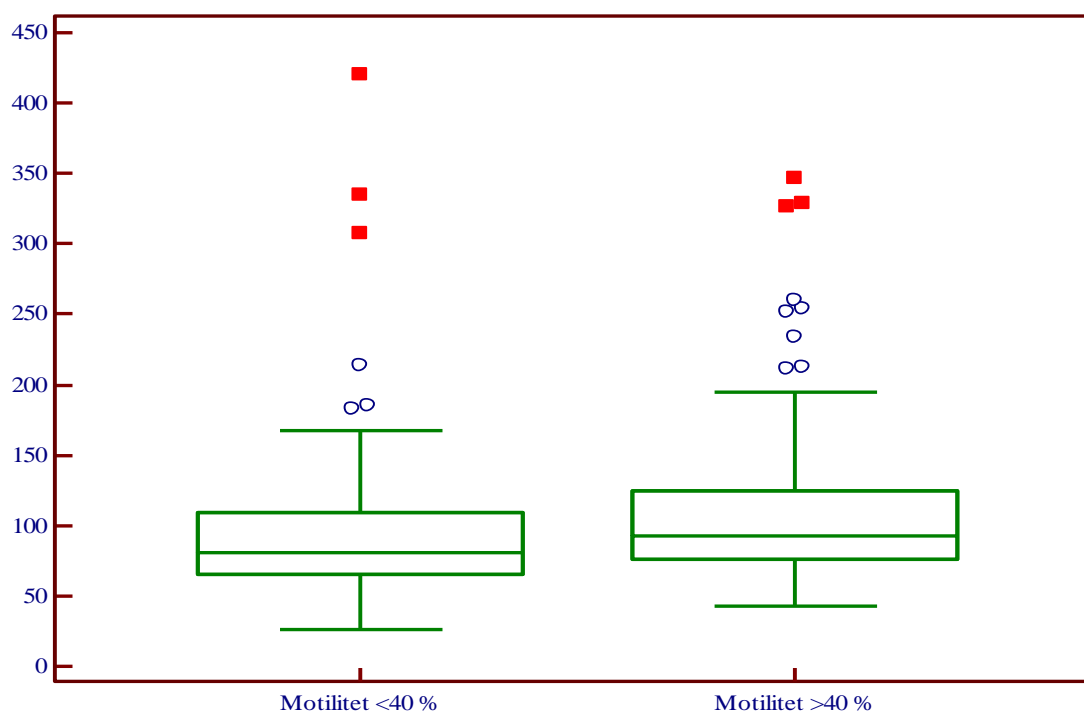
5.4. Povezanost koncentracije bakra u sjemenjnoj plazmi s pokretljivošću spermija u sjemenjnoj tekućini

Medijan postotka pokretljivih spermija u sjemenjnoj tekućini za sve ispitanike je 45,5% (IQR 32,5 – 55). S obzirom na motilitet spermija, 127 ispitanika (65 %) imalo je postotak pokretljivih spermija iznad donje granice referentnog područja (> 4 %) prema preporukama WHO-a (normozoospermija), a 69 ispitanika (35 %) imalo je postotak pokretljivih spermija ispod donje granice referentnog područja prema preporukama WHO-a. Koncentracija bakra u sjemenjnoj plazmi pokazala je statistički značajnu povezanost (Mann – Whitney test, P = 0,0421) s pokretljivošću spermija, odnosno koncentracija bakra u skupini koja ima postotak pokretljivih spermija iznad 40 % veća je nego u skupini sa smanjenom pokretljivošću spermija (Tablica 5, Slika 1). Koncentracija bakra u sjemenjnoj plazmi nije pokazala korelaciju s postotkom pokretnih spermija u sjemenjnoj tekućini (Pearsonov koeficijent korelacije $r = 0,02850$, 95 % CI - 0,1121 – 0,1680, P = 0,6917).

Tablica 5. Povezanost koncentracije bakra u sjemenjnoj plazmi s motilitetom spermija u sjemenjnoj tekućini

| | Ispitanici s normalnim motilitetom spermija (N = 127) | Ispitanici sa sniženim motilitetom spermija (N = 69) | P |
|---|--|---|--------------------|
| Dob ispitanika (godine) | 34 (31 – 39) | 36 (32 – 40) | 0,2172 |
| Udio pokretnih spermija (%) | 54 (47 – 60) | 25 (0 – 35) | < 0,0001 |
| Koncentracija Cu u sjemenjnoj plazmi (µg/l) | 92,94 (75,51 – 124,36) | 80,45 (64,87 – 108,88) | 0,0421 |

Sve vrijednosti su medijan s interkvartilnim rasponom (IQR); P – statistička značajnost (Mann – Whitney test)



Slika 1. Prikaz povezanosti koncentracije bakra u sjemenjnoj plazmi s pokretljivošću spermija

- četverokut označuje interkvartilni raspon, a njegova središnja linija medijan, minimalna i maksimalna vrijednost prikazane su vodoravnim linijama ispod i iznad četverokuta, stršće vrijednosti kružićima, a ekstremne vrijednosti kvadratićima

6. RASPRAVA

Bakar je mikroelement koji je vrlo važan za funkciju određenih enzima u organizmu (superoksid dismutaza, amino oksidaza, tirozinaza i dr.). No, previsoka izloženost bakru (Cu) može imati neželjene posljedice zbog oksidativnih učinaka bakra na lipide i proteine, vezanja na DNA i pospješivanja nastanka slobodnih radikala (15). Zbog navedenih razloga, utjecaj Cu na spermatogenezu i mušku plodnost teško je procijeniti i slična istraživanja su rezultirala različitim rezultatima (1).

Jedan od mogućih uzroka diskrepance u rezultatima istraživanja povezanosti Cu i muške reproduktivne funkcije je i nehomogenost analitičkih metoda određivanja (atomska apsorpcijska spektrometrija – AAS, ICP, ICP – MS i dr.), što za posljedicu ima vrlo različite raspone koncentracije bakra u sjemennoj plazmi u objavljenim radovima. Koncentracije Cu u sjemennoj plazmi naših ispitanika određene ICP – MS metodom bile su reda veličine 100 µg/l (medijan 91,04 µg/l, najmanja vrijednost 26,43 a najveća 420,3 µg/l), što odgovara vrijednostima koje su dobili Živković i sur. (16) na hrvatskim ispitanicima (medijan 83,21 µg/l, ICP – MS), Apostoli i sur. (17) na talijanskim ispitanicima (srednja vrijednost 75 µg/l, ICP – MS) i Zafar i sur. na pakistanskim ispitanicima (srednja vrijednost 77,74 µg/l, ICP – MS) (1, 16). Ostali autori dobivali su vrlo različite vrijednosti na različitim populacijama i rađeno različitim metodama: od 15,5 µg/l (srednja vrijednost, AAS, Indija); 195 µg/l (srednja vrijednost, ICP – MS, Kina); 570,3 µg/l (srednja vrijednost, ICP – MS, Japan) pa sve do 941,3 µg/l (srednja vrijednost, AAS, Turska) (16). Toliko široki raspon koncentracija, čak i u istraživanjima koji su određivali Cu istim ili sličnim tehnikama definitivno govori u prilog nužnoj harmonizaciji analitičkih tehnika u određivanju mikroelemenata i teških metala u sjemennoj plazmi.

Povezanost koncentracije Cu u sjemennoj plazmi s koncentracijom spermija među našim ispitanicima nije pronađena (Tablica 2), no neki autori su pronašli statistički značajnu povezanost: Li i sur. su pronašli negativnu korelaciju koncentracije Cu u sjemennoj plazmi s koncentracijom spermija (18), slično kao i Jeng i sur. koji su u skupini ispitanika s normalnom koncentracijom spermija (prema WHO – u) pronašli nižu koncentraciju Cu nego u skupini sa sniženom koncentracijom spermija (19) ili Zafar i sur. koji su u skupini ispitanika s azoospermijom pronašli daleko višu koncentraciju Cu nego u skupini s normalnom koncentracijom spermija (20), ali i Skandhan i Jockenhoven koji su, potpuno suprotno, pronašli veću koncentraciju Cu u sjemennoj plazmi u skupini s normalnom koncentracijom

nego u skupini s azoospermijom (9, 21). No, isto tako, većina drugih autora, kao i mi, nije pronašla povezanost koncentracije Cu u sjemenoj tekućini s koncentracijom spermija (22 – 24).

Povezanost koncentracije Cu u sjemenoj plazmi s morfologijom spermija nešto je rjeđe proučavana od strane drugih autora, a rezultati su bili negativni kao i naši (Tablica 3), odnosno nije pronađena povezanost (18, 19, 22).

Slično je i s povezanošću koncentracije Cu u sjemenoj plazmi s vitalnošću spermija gdje smo pronašli samo dva rada s objavljenim rezultatima koji su bili negativni kao i naši (Tablica 4), odnosno nije pronađena povezanost (19, 24).

Povezanost koncentracije Cu u sjemenoj plazmi s pokretljivošću spermija u sjemenoj tekućini posebno je zanimljiva, budući da bakar sudjeluje u lipidnoj peroksidaciji membrane spermija i inhibira oksidativne procese i potrošnju glukoze, što smanjuje ili čak potpuno sprječava mobilnost spermija, što je svojstvo koje se pokušava implementirati u dizajnu kontraceptivnih implantata (3). No, isto tako, bakar ima važnu ulogu kao kofaktor enzima superoksid dismutaze koji štiti spermije od reaktivnih kisikovih spojeva i peroksidacije (25). U našem istraživanju dobili smo statistički značajnu povezanost koncentracije Cu s pokretljivošću spermija u sjemenoj tekućini (Tablica 5), odnosno koncentracija Cu je bila veća u skupini ispitanika s normalnim postotkom pokretljivih spermija u odnosu na skupinu s pokretljivošću ispod normalne razine (prema WHO – u). Slične rezultate dobili su i Jockenhovel i sur. (9), Wong i sur. (25) te Hashemi i sur. (26) kod kojih su ispitanici s normalnim motilitetom spermija imali više koncentracije Cu u sjemenoj plazmi (kod Wonga u krvi). No, isto tako Skandhan i sur. (21) te Huang i sur. (27) su dobili suprotne rezultate, odnosno više koncentracije Cu u sjemenoj plazmi u skupini s motilitetom ispod normalne razine. Većina drugih autora nije dobila statistički značajnu povezanost koncentracije Cu s pokretljivošću spermija u sjemenoj tekućini (18, 19, 22, 24, 28).

Utjecaj bakra u sjemenoj plazmi na pokretljivost spermija u sjemenoj tekućini se očito može ispoljiti na različite načine, od protektivnih do destruktivnih, što u istraživanjima rezultira kontradiktornim rezultatima, ali to je još jedan razlog za daljnje proučavanje te problematike jer svaka nova informacija može biti jedan dio u slagalici koji će možda otkriti pravu ulogu bakra u regulaciji reproduktivne funkcije muškaraca.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata provedenog istraživanja te dobivenih rezultata i usporedbom s rezultatima drugih sličnih istraživanja, možemo zaključiti sljedeće:

- Povezanost koncentracije Cu u sjemennoj plazmi s koncentracijom spermija među našim ispitanicima nije pronađena.
- Povezanost koncentracije Cu u sjemennoj plazmi s morfologijom spermija među našim ispitanicima nije pronađena.
- Povezanost koncentracije Cu u sjemennoj plazmi s vitalnošću spermija među našim ispitanicima nije pronađena.
- Pronađena je statistički značajna povezanost koncentracije Cu s pokretljivošću spermija u sjemennoj tekućini. Koncentracija Cu je bila veća u skupini ispitanika s normalnim postotkom pokretljivih spermija u odnosu na skupinu s pokretljivošću ispod normalne razine (prema preporukama WHO-a).

Zbog širokog raspona koncentracija u objavljenim istraživanjima nužna je harmonizacija analitičkih tehnika u određivanju mikroelemenata i teških metala u sjemennoj plazmi.

Zbog kontradiktornih rezultata potrebna su daljnja istraživanja koja će pomoći rasvijetliti ulogu bakra u regulaciji reproduktivne funkcije muškarca.

8. SAŽETAK

Ciljevi: Ciljevi istraživanja su utvrditi postoji li statistički značajna povezanost koncentracije bakra u sjemennoj plazmi s parametrima spermograma; koncentracijom, morfologijom, vitalnošću i pokretljivošću spermija u sjemennoj tekućini.

Ispitanici i metode: U istraživanju je sudjelovalo 196 muških ispitanika koji su u postupku zbog ispitivanja neplodnosti. Na uzorcima ispitanika rađen je spermogram prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije te određivanje bakra u sjemennoj plazmi ICP – MS metodom.

Rezultati: Koncentracije Cu u sjemennoj plazmi naših ispitanika određene ICP – MS metodom bile su: medijan 91,04 (IQR 70,69 – 117,90) µg/l, najmanja vrijednost 26,43, a najveća 420,3 µg/l. Medijan koncentracije spermija u sjemennoj tekućini za sve ispitanike je $58,5 \times 10^6/\text{mL}$ (IQR 20 – 116,5). Medijan postotka morfološki normalnih spermija u sjemennoj tekućini za sve ispitanike je 20 % (IQR 13 – 26). Medijan postotka živih spermija u sjemennoj tekućini za sve ispitanike je 51 % (IQR 37,5 – 60,0). Medijan postotka pokretnih spermija u sjemennoj tekućini za sve ispitanike je 45,5 % (IQR 32,5 – 55,0). Koncentracija bakra u sjemennoj plazmi pokazala je statistički značajnu povezanost ($P = 0,0421$) s pokretljivošću spermija, odnosno koncentracija bakra u skupini koja ima postotak pokretnih spermija iznad 40 % veća je nego u skupini sa smanjenom pokretljivošću spermija.

Zaključak: Nije pronađena statistički značajna povezanost koncentracije bakra u sjemennoj plazmi s koncentracijom, morfologijom i vitalnošću spermija. Pronađena je statistički značajna povezanost koncentracije bakra u sjemennoj plazmi s pokretljivošću spermija, što je zabilježeno i u nekim drugim sličnim istraživanjima. Zbog kontradiktornih rezultata potrebna su daljnja istraživanja koja će pomoći rasvijetliti ulogu bakra u regulaciji reproduktivne funkcije muškarca.

Ključne riječi: metali, neplodnost, bakar, spermogram, ICP – MS

9. SUMMARY

The correlation of the copper concentration in the seed plasma with the seed fluid parameters analysis

Objectives: The objectives of the study are to determine whether there is a statistically significant correlation of copper concentrations in seminal plasma with spermiogram parameters; concentration, morphology, vitality, and sperm motility in seminal fluid.

Subjects and Methods: The study involved 196 male subjects who are in the process of infertility testing. A spermiogram has been conducted on the sample of the study according to the recommendations of the World Health Organization, and the determination of copper in the seminal plasma by the ICP - MS method has also been conducted.

Results: The concentrations of Cu in the seminal plasma of our subjects determined by the ICP – MS method were: median 91.04 (IQR 70.69 - 117.90) µg/l, the lowest value 26.43 and the maximum 420.3 µg/l. The median sperm concentration in seminal fluid for all subjects is 58.5×10^6 /mL (IQR 20 - 116.5). The median percentage of morphologically normal sperm in seminal fluid for all subjects is 20 % (IQR 13 - 26). The median percentage of live sperm in seminal fluid for all subjects is 51 % (IQR 37.5 - 60.0). The median percentage of motile sperm in seminal fluid for all subjects is 45.5 % (IQR 32.5 - 55.0). The concentration of copper in seminal plasma has showed statistically significant correlation ($P = 0.0421$) with sperm motility, i.e. the concentration of copper in the group that has a percentage of motile sperm above 40 % is higher than in the group with reduced sperm motility.

Conclusion: No statistically significant correlation of copper concentrations in seminal plasma has been established with the concentration, morphology or sperm vitality. A statistically significant correlation between the concentration of copper in seminal plasma and the sperm motility has been observed, which has also been recorded in some other similar studies. Due to the contradictory results, further research is needed in order to help clarify the role of copper in the regulation of male reproductive function.

Keywords: metals, infertility, copper, spermiogram, ICP – MS

10. LITERATURA

1. Sun J, Yu G, Zhang Y, Liu X, Du C, Wang L, et al. Heavy Metal Level in Human Semen with Different Fertility: a Meta-Analysis. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. 2017;176(1):27–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-016-0804-2>
2. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN, Blessy A, et al. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. 2014 [cited 2019 May 15]; Available from: <http://www.thegef>.
3. Sengupta P. Environmental and occupational exposure of metals and their role in male reproductive functions. *Drug Chem Toxicol*. 2013;36(3):353–68.
4. HZJZ. Hrvatski Zdravstveno-Statistički Ljetopis Za 2017 . Godinu. Zagreb; 2017.
5. Bauman R. Obrada i terapija neplodnosti Diagnostics and treatment of infertility. *Med Flum*. 2009;45(4):300–12.
6. WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010. xiv, 271 p.
7. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2009;16(3):231–45.
8. Švub I. Biokemijski pokazatelji u sjemennoj plazmi životinja i ljudi. 2018 Sep 24 [cited 2019 May 15]; Available from: <https://zir.nsk.hr/en/islandora/object/vef%3A367>
9. Jockenhovel F, Bals-Pratsch M, Bertram HP, Nieschlag E. Seminal lead and copper in fertile and infertile men. *Andrologia*. 1990;22:503–11.
10. Wirth JJ, Mijal RS. Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function. *Syst Biol Reprod Med*. 2010;56(2):147–67.
11. Meeker JD, Rossano MG, Protas B, Diamond MP, Puscheck E, Daly D, et al. Cadmium, lead, and other metals in relation to semen quality: human evidence for molybdenum as a male reproductive toxicant. *Env Heal Perspect*. 2008;116(11):1473–9.

12. Bornhorst JA, McMillin GA. Trace and Toxic Elemental Testing in the Clinical Laboratory. *Lab Med*. 2007;37(11):690–5.
13. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol* [Internet]. 2014;7(2):60–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26109881> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4427717>
14. Coen N, Mothersill C, Kadhim M, Wright EG. Heavy metals of relevance to human health induce genomic instability. *J Pathol* [Internet]. 2001 Oct 1 [cited 2019 May 15];195(3):293–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.950>
15. Abdul-Rasheed O. Association Between Seminal Plasma Copper and Magnesium Levels with Oxidative Stress in Iraqi Infertile Men. *Oman Med J*. 2010;25(3):168–72.
16. Živković T, Tariba B, Pizent A. Multielement analysis of human seminal plasma by octopole reaction cell ICP-MS. *J Anal At Spectrom*. 2014;29(11):2114–26.
17. Apostoli P, Porru S, Morandi C, Menditto A. Multiple determination of elements in human seminal plasma and spermatozoa. *J Trace Elem Med Biol* [Internet]. 1997;11(3):182–4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0946-672X\(97\)80052-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0946-672X(97)80052-1)
18. Li P, Zhong Y, Jiang X, Wang C, Zuo Z, Sha A. Seminal plasma metals concentration with respect to semen quality. *Biol Trace Elem Res*. 2012;148(1):1–6.
19. Jeng HA, Huang Y-L, Pan C-H, Diawara N. Role of low exposure to metals as male reproductive toxicants. *Int J Environ Health Res*. 2015 Jul;25(4):405–17.
20. Zafar A, Eqani SAMAS, Bostan N, Cincinelli A, Tahir F, Shah STA, et al. Toxic metals signature in the human seminal plasma of Pakistani population and their potential role in male infertility. *Environ Geochem Health*. 2015;37(3):515–27.
21. Skandhan KP, Mazumdar BN. Semen copper in normal and infertile subjects. *Experientia*. 1979;35(7):877–8.
22. Nenkova G, Petrov L, Alexandrova A. Role of trace elements for oxidative status and quality of human sperm. *Balkan Med J*. 2017;34(4):343–8.
23. Inhorn MC, King L, Nriagu JO, Kobeissi L, Hammoud N, Awwad J, et al.

- Occupational and environmental exposures to heavy metals: Risk factors for male infertility in Lebanon? *Reprod Toxicol.* 2008;25(2):203–12.
24. Akinloye O, Abbiyesuku FM, Oguntibeju OO, Arowojolu AO, Truter EJ. The impact of blood and seminal plasma zinc and copper concentrations on spermogram and hormonal changes in infertile Nigerian men. *Reprod Biol.* 2012;11(2):83–97.
 25. Wong WY, Flik G, Groenen PMW, Swinkels DW, Thomas CMG, Copius-Peereboom JHJ, et al. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod Toxicol.* 2001;15(2):131–6.
 26. Hashemi MM, Behnampour N, Nejabat M, Tabandeh A, Ghazi-Moghaddam B, Joshaghani HR. Impact of Seminal Plasma Trace Elements on Human Sperm Motility Parameters. *Rom J Intern Med.* 2017;56(1):15–20.
 27. Huang YL, Tseng WC, Cheng SY, Lin TH. Trace elements and lipid peroxidation in human seminal plasma. *Biol Trace Elem Res.* 2000;76(3):207–15.
 28. Aydemir B, Kiziler AR, Onaran I, Alici B, Ozkara H, Akyolcu MC. Impact of Cu and Fe concentrations on oxidative damage in male infertility. *Biol Trace Elem Res.* 2006;112(3):193–204.

11. ŽIVOTOPIS

- Ime i prezime: Sabina Drempetić
- Adresa stanovanja: Golubovečka 49 a, 49240 Donja Stubica
- Datum i mjesto rođenja: 30.5.1994., Zagreb, Hrvatska
- Telefon: +385992095188
- E – pošta: sabina.drempetic94@gmail.com

Školovanje i obrazovanje:

- 2016. – danas. Diplomski sveučilišni studij medicinsko – laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Osijek
- 2013. – 2016. Stručna prvostupnica (*baccalaureus*) medicinsko – laboratorijske dijagnostike, Zdravstveno veleučilište Zagreb
- 2009. – 2013. Srednja Škola Oroslavje, smjer opća gimnazija
- 2001. – 2009. Osnovna škola Donja Stubica